

⑫ 公開特許公報(A)

平2-237935

⑬ Int. Cl.⁵

A 61 K 39/395
 // C 12 P 21/08
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)

識別記号

ADY S

庁内整理番号

8829-4C
 8214-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)9月20日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 エイズ処置剤

⑯ 特 願 平1-59216

⑰ 出 願 平1(1989)3月10日

⑱ 発 明 者 小 林 信 之 山口県宇部市小串382-1 山口大学小串宿舍1号
 ⑱ 発 明 者 佐 々 木 一 山形県山形市東青田3-9-18
 ⑱ 発 明 者 星 宏 良 山形県山形市城西町5-10-5-C102
 ⑲ 出 願 人 株式会社バイオ科学研 山形県山形市城西町5丁目34番5号
 究所
 ⑳ 代 理 人 弁理士 廣 瀬 孝 美

明 細 書

1. 発明の名称

エイズ処置剤

2. 特許請求の範囲

1. 下記の性状を有するモノクローナル抗体を有効成分として含有するエイズ処置剤。

(1) ヒト二倍体線維芽細胞F S⁻7を認識する。

(2) クラスがIgMである。

(3) 分子量が200Kである。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明はエイズ処置剤に関し、さらに詳細にはモノクローナル抗体を有効成分とし、エイズの予防、治療等に有用なエイズ処置剤に関する。

<従来の技術及び発明が解決しようとする課題>

エイズ(後天性免疫不全症候群)はエイズ・ウイルスに起因する予後不良の免疫不全症である。エイズ・ウイルスはHTLV-Ⅲ(Human T-cell Leukemia Virus-Ⅲ)とも称されるが、現在ではHIV(Human immunodeficiency Virus)と表現さ

れている。このウイルスはヒトレトロウイルスに属し、このウイルスに感染するとリンパ球のヘルパーT細胞が特異的に障害を受け、免疫応答能が破壊される結果、真菌、ウイルス、細菌などによる日和見感染、肉腫等が発生し、70%以上の高死亡率を招くことが知られている。

この疾患に対する治療剤としては、従来、幾つかの薬剤が報告されている。それらの多くは、HIV中に含まれ、レトロウイルスの複製に重要な役割を果たす逆転写酵素を阻害する作用を有するもので、例えば、3'-アジド-2'-デオキシチミン、スミラン、2', 3'-ジデオキシシチジン等が知られている。しかしながら、これらの薬剤は副作用が強く、またHIVの感染予防には有効でもHIVに感染した細胞を除去することはできないので、治療効果が十分なものとはいえない。

また、腫瘍壊死因子(TNF)を用いた治療法も検討されているが、TNFはHIVの増殖も増強するという欠点を有する。さらに、免疫抑制剤であるシクロスポリン、T細胞増殖刺激剤である

インターロイキン-2等を用いた治療法も検討されているが十分な効果は得られていない。

本発明は上記従来技術の欠点を解消するために創案されたもので、本発明者らが種々の検討を重ねた結果、ある種のモノクローナル抗体がHIVの増殖をもたらすことなくHIV感染細胞の増殖を抑制し得ることを見出し、本発明を完成したもので、新規なエイズ処置剤を提供することを目的とする。

<課題を解決するための手段>

上記の課題を解決すべくなされた、本発明のエイズ処置剤は、下記の性状を有するモノクローナル抗体を有効成分として含有することの特徴とするものである。

- (1) ヒト二倍体線維芽細胞FS-7を認識する。
- (2) クラスがIgMである。
- (3) 分子量が200Kである。

本発明で使用される上記のモノクローナル抗体（以下、抗Fas抗体という）は、例えば、ヒト二倍体線維芽細胞FS-7で免疫して得られた実

ドーマが抗体を産生しているか否かの検定を細胞（ヒト細胞）障害活性の測定により行ない、抗体を産生するハイブリドーマを選択する。抗体産生の認められたウエルのハイブリドーマは、限外希釈法又はシングル・セル・マニプレーション（倒立顕微鏡下、1ウエルに1個のハイブリドーマを入れる方法）等の慣用の方法にてクローニングを2回行ない、抗Fas抗体産生ハイブリドーマ株を選択する。斯くして得られた抗Fas抗体産生ハイブリドーマ株を無血清培地ASF104で培養し、上清をハイドロキシルアパタイト・カラムクロマトグラフィで精製して、精製抗Fas抗体が得られる。

上記方法で得られた抗Fas抗体は、クラスがIgMであり、分子量が200K（ウエスタン・ブロッティング法による）である。

本発明の処置剤は上記抗Fas抗体を有効成分とするもので、有効成分の投与量は、患者の年齢、体重、症状、疾患の程度等により適宜決定されるが、一般に0.01～100μg/kg体重・日、

実験動物のリンパ球とミエローマ細胞との細胞融合によって得られたハイブリドーマをクローニングして樹立したハイブリドーマ株から産生され、米原らにより報告されている（例えば、Proceedings of the Japanese Cancer Association, 47th Annual Meeting (1988) p452 など参照）。

より詳細には、6週齢のBalb/c雌性マウスに、ヒト包皮由来ヒト二倍体線維芽細胞FS-7（約 3×10^6 個）を腹腔内投与して免疫する。2週間後、上記ヒト二倍体線維芽細胞FS-7（約 2×10^6 個）を腹腔内投与して追加免疫する。3日後、マウスの免疫脾臓細胞を取り出し、ポリエチレングリコール等の細胞融合促進剤を用いてマウスミエローマ細胞NS-1と融合させる。次いで、融合細胞の培養を、HAT培地（正常培地にヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを添加した培地）等のハイブリドーマ選択培地を用いて経時的に徐々に高濃度とした培地中で行ない、ハイブリドーマ以外の細胞を死滅させてハイブリドーマを選択する。各ウエル中のハイブリ

ドーマは0.1～10μg/kg体重・日である。

本発明の処置剤は、経口又は非経口投与のいずれも採用することができる。投与に際しては、有効成分である抗Fas抗体を経口投与、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤等の慣用の添加剤を適宜添加することができる。

< 発明の作用・効果 >

本発明の処置剤の有効成分である抗Fas抗体は、HIVに感染した細胞の増殖を特異的に抑制することができ、またその際にHIVの増殖を促進しないという特性を有する。従って、抗Fas抗体を有効成分として含有する本発明の処置剤は、エイズの予防、治療等に極めて有用である。

< 実施例 >

以下、試験例及び実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

試験例 1

HIV感染細胞に対する抗Fas抗体の増殖抑制効果を調べるため、HIVに感染し、ウイルスを産生しながら増殖するMOLT-4細胞を用いて試験した。試験法は下記のとおりである。

ヒト成人T細胞白血病リンパ球由来の株化細胞MOLT-4 (J. Natl. Cancer Inst., Vol. 49, pp891, 1972 参照) を、感染多重度(a.o.i.) 0.002 にてHTLV-III Bで感染させ、HIV感

● …… MOLT-4 / HIV細胞 1日目

○ …… 同上 2日目

○ …… 同上 3日目

第1図に示されるように、HIV非感染MOLT-4細胞は、抗Fas抗体濃度に対する生存率の低下がさほど認められない。一方、MOLT-4 / HIV細胞は抗Fas抗体濃度に依存して生存率の低下が認められ、50 ng/mlの添加量における3日目の生存率は数%であった。このことより、抗Fas抗体は特異的にMOLT-4 / HIV細胞の増殖を抑制することが判った。

試験例 2

抗Fas抗体のHIVの増殖促進性を試験するため、MOLT-4 / HIV細胞を抗Fas抗体で処理し、ドット・プロット・ハイブリダイゼーション法により、HIV及びβ-アクチンのmRNA量を調べた。試験法は以下のとおりである。

MOLT-4 / HIV細胞を10 ng/mlの抗Fas抗体を含有する培地で1日処理した。低速遠心分離により細胞を分離し、冷生理食塩水で2回洗

せMOLT-4 (以下、MOLT-4 / HIVという) 細胞を樹立した。

HIV非感染MOLT-4細胞及びMOLT-4 / HIV細胞を、種々の濃度の抗Fas抗体を含むRPMI-1640培地(10%胎児牛血清、100IU/mlペニシリン及び100 μg/mlストレプトマイシン含有)で培養した。また、コントロールとして、抗Fas抗体を含有しない上記培地を用いて同様に培養した。培養1日目、2日目及び3日目に、それぞれトリパンブルー色素排除法により生存細胞数を計測し、下記式から細胞の生存率(%)を求めた。

生存率(%) =

$$\frac{\text{抗Fas抗体添加培地中の生存細胞数}}{\text{コントロール培地中の生存細胞数}} \times 100$$

その結果を第1図に示す。なお、同図中の符号の意味は下記のとおりである。

■ …… HIV非感染MOLT-4細胞 1日目

□ …… 同上 2日目

□ …… 同上 3日目

浄した。1 × 10⁵ 個の細胞を100 μlの氷冷TE (10 mMトリス-塩酸、1 mM EDTA含有) 及び0.5% Nonidet P-40中に再懸濁し、氷浴中で15分間激しく攪拌した。細胞溶解産物はエッペンドルフ・マイクロチューブを用いて15,000rpmで15分間遠心分離した。上清は150 μlのホルムアルデヒド及び150 μlの20 × SSCと混合し、60℃で15分間インキュベートした。この溶液は使用するまで-20℃に保存した。

このようにして得られたRNA溶液のうち、1 × 10⁵ 個の細胞に相当する溶液をニトロセルロース膜に固定化し、³²P 標識プローブとハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションは、5 × SSPE、5 × Denhart's、50%ホルムアミド、0.2% SDS及び200 μg/mlの熱変性サケ精子DNA中、42℃で16時間行なった。該膜の洗浄は、最初は2 × SSPEと0.2% SDSで行ない、次いで0.1 × SSPEと0.2% SDSを用い50℃にて行なった。この試験で用いたHIV特異プローブは、HIV-1ゲノムの約

90%をカバーするpNK5.2のSacIフラグメントであり、ヒトβ-アクチン特異プローブは、λHa180の0.44kbHinfIフラグメントである。また、用いた³²P標識プローブの比活性は約 4×10^8 dpm/μg・DNAである。

その結果、HIV及びβ-アクチンのmRNA量は、両者とも抗Fas抗体処理により本質的な変化はなく、抗Fas抗体にはHIVの増殖促進作用がないことを示した。

実施例

抗Fas抗体を適当量の生理食塩水(20%マニトール含有)に溶解し、pH調整を行った後、滅菌したミリポアフィルターで除菌濾過し、バイアル瓶に充填して凍結乾燥することにより注射用粉末製剤を得た。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、HIV非感染MOLT-4細胞及びMOLT-4/HIV細胞を、抗Fas抗体含有培地で培養したときのコントロールに対する生存

率を示すグラフである。同図中の符号の意味は下記のとおりである。

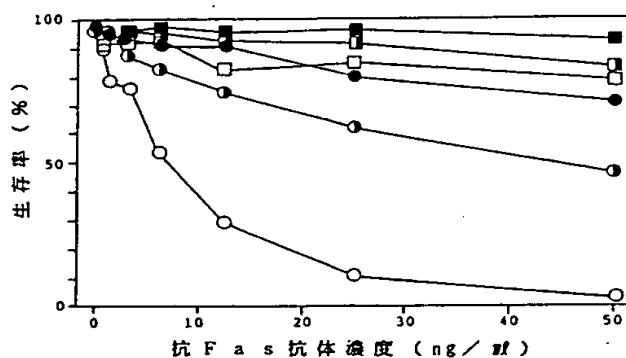
- …… HIV非感染MOLT-4細胞1日目
- ▣ …… 同上2日目
- …… 同上3日目
- …… MOLT-4/HIV細胞1日目
- ⊙ …… 同上2日目
- …… 同上3日目

特許出願人 株式会社バイオ科学研究所

代理人 弁理士 廣瀬 孝 美



第 1 図



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-237935

(43)Date of publication of application : 20.09.1990

(51)Int.Cl.

A61K 39/395
// C12P 21/08
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 01-059216

(71)Applicant : BIO KAGAKU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 10.03.1989

(72)Inventor : KOBAYASHI NOBUYUKI
SASAKI HAJIME
HOSHI HIROYOSHI

(54) AIDS TREATING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a treating agent containing a specific monoclonal antibody as an active ingredient, capable of specifically suppressing proliferation of cell infected to HIV without promoting none of proliferation of HIV and extremely useful in prevention and remedy for AIDS.

CONSTITUTION: The AIDS treating agent containing a monoclonal antibody recognizing a human diploid fibroblast cell FS-7, being IgM in the class and having 200K molecular weight as active ingredient. The above-mentioned antibody is obtained by fusing a lymphocyte of experimental small animal obtained by immunizing with a human diploid fibroblast FS-7 with myeloma cell and subjecting the resultant hybridoma to cloning and culturing the established hybridoma strain. Dose of the antibody is 0.01-100μg, preferably 0.1-10μg/kg day.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)